

論文要約

論文題名

Autophagy prevents osteocyte cell death under hypoxic conditions.
(オートファジーは、低酸素条件下における骨細胞の細胞死を抑制する。)

掲載雑誌名

Cells Tissues Organs

歯学研究科 歯学専攻(顎顔面口腔外科学) 博士課程 氏名 栗原 舞

論文要約

【背景・目的】低酸素症は、癌、心臓病、虚血などの重要な臨床症状で発生する。[1]ただし、低酸素症と骨細胞のオートファジーの関係はまだ不明である。したがって、そこで本研究では、低酸素環境下での骨細胞の生存、特にオートファジーおよびアポトーシス、ネクローシスに向かう制御機構を解明し、細胞死から細胞を保護するような薬剤を検討した。

【方法】ML0-Y4 細胞株を 1, 2, 4%の低酸素環境に曝露し、MTT assay および caspase3/7 の活性測定を行い、適正な酸素分圧の決定を行った。次いで、2%の酸素分圧に細胞を曝露し、免疫蛍光染色においてオートファジータンパクである LC3 および p62 の発現の解析、MTT assay および caspase3/7 の活性測定を行い、アポトーシスの発現を検索した。次いで、オートファジー阻害剤である 3-メチルアデニン(3MA)を添加し同様の実験を行い、同様の測定を行った。また、エストラジオールおよび活性型ビタミン D を添加し細胞死に対する抑制効果を検索するために同様の実験を行い、最後に、シグナル伝達経路の検索のためにウエスタンブロットを行った。

(倫理審査委員会承認番号：)

【結果】マウス骨細胞株である ML0-Y4 細胞[2]は、さまざまな O₂ 分圧に曝露した結果、細胞はアポトーシス、オートファジー、ネクローシスを起こした。それにより本研究では 2%の酸素分圧を使用することとした。2%酸素分圧に細胞を曝露し、免疫蛍光染色を行ったところ、ML0-Y4 細胞で LC3 の増加と p62 の減少を示した。次いで、エストラジオールおよび活性型ビタミン D を添加したところ、エストラジオールでは、コントロール群と大きな差はなかった。活性型ビタミン D を添加すると、コントロール群と比較して、活性型ビタミン D 群においての LC3 の発現を多く認めた。更に、3MA を添加するとそれによって抑制された LC3 の発現が有意に回復した。

【考察】オートファジーは、骨芽細胞や破骨細胞を含むさまざまな細胞の細胞生存および細胞死プロセスと密接に関連している。[3, 4]細胞が低酸素または無酸素環境にさらされると、骨芽細胞でオートファジーが誘発されることが知られている。[3]ただし、低酸素症と骨細胞のオートファジーとの関係はまだ不明である。したがって、我々は、低酸素状態での骨細胞の生存に関する調節メカニズムを明らかにするために、本研究を行った。低酸素分圧 2%では、アポトーシス、オートファジーおよびネクローシスを起こし、酸素分圧を決定した。この酸素分圧は、細胞の生存および細胞死の検索に最適であると仮定した。2%酸素分圧に 48 時間細胞を曝露したところ LC3 の発現が上昇、p62 の発現が低下することにより、骨細胞を低酸素環境に曝露するとオートファジーが誘導されることが示された。一方、エストラジオールはステロイドホルモンの一種であり、骨代謝の重要な調整因子である。[5]また、活性型ビタミン D もエストラジオール同様ステロイドホルモンであり、骨芽細胞に作用し骨代謝の調整を行っている。[6]このような知見からエストラジオールと活性型ビタミン D は骨細胞の低酸素におけるアポトーシスおよびオートファジーに重要な働きをしていると仮説を立てた。活性型ビタミン D を添加するとオートファジーを誘導し細胞死を抑制したが、エストラジオールにその作用は認めなかった。これらの結果は、2つの薬剤の作用機序の違いより、遺伝子の下流の違いによって差がでるのではないかと考えた。また、ウエスタンブロットにおいて、3MA、エストラジオール、活性型ビタミン D 添加、非添加に関わらず、mTOR シグナルの発現に変化を認めなかった。結果は予想に反して、活性型ビタミン D によるオートファジーの効果は mTOR 経路に非依存的であると示された。今後 *in vitro* の実験でどのシグナル伝達経路が関与しているのかを検索する必要があるが、mTOR シグナル以外の伝達経路に依存したオートファジーの誘導については、我々が知り得る限りでは報告がない。従って、新たなシグナル伝達経路の存在がある可能性があるのではないかと仮説を立てた。また、将来的には活性型ビタミン D 阻害剤等を用いて、低酸素環境における骨細胞へのオートファジーの作用を *in vivo* にて確認する必要がある。

【参考文献】 3～10 編

- [1] M. Hubbi, G. Semenza, "Regulation of cell proliferation by hypoxia-inducible factors," *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, vol.309 C775-C782, 2015.
- [2] Y. Kato, J. Windle et al, "Establishment of an osteocyte-like

cell line, MLO-Y4,” Journal of Bone and Mineral Research, vol.12 pp2014-2023, 1997.

[3] A. Zahm, J. Bohensky, C. Adams et al “Bone cell autophagy is regulated by environmental factors,” Cells Tissues Organs, vol.194 pp274-278, 2011.

[4] Y. Zhao, G. Chen, W. Zhang et al, “Autophagy regulates hypoxia-induced osteoclastogenesis through the HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway,” Journal of Cellular Physiology, vol. 227 pp639-648, 2012.

[5] S. Khosla, L. Melton, B. Riggs, “The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: Is a revision needed?,” Journal of Bone and Mineral Research, vol.26 pp441-451, 2011.

[6] H. Orimo, M. Shiraki, Y. Hayashi et al, “Effects of 1 α -hydroxyvitamin D3 on lumbar bone mineral density and vertebral fractures in patients with postmenopausal osteoporosis,” Calcified Tissue International, vol.54 pp370-376, 1994.

【利益相反(COI)】

利益相反はない